

土壤細菌研究法の概要

荒川 左千代

一、緒言

抑も土壤細菌學は一般細菌學より分立したるものであつて其獨立したのは極めて近年のことである。(板野新夫著本誌第九卷 大正十五年)

従つてその研究法に至つても一般細菌學の研究法を其鑑踏襲する所が甚だ多かつたのである。從來は専ら細菌の形態學的研究が行はれ其種類を決定することが重要な目的に屬してゐたけれ共近來は其純粹培養(又は混合培養)を行つて培養上に於ける性質を研究し更に進で其生理化學的竝に生理物理學的機能の研究せんとすること竝に土壤肥沃との關係に就きての研究等が重要な時代となつて來てわすか二三十年の短い歴史をしか有しないに拘はらず其の間に於ける斯學の進歩發達は素晴しく急速なるものがあつて敢て他と遜色なき業績も多々擧げられてゐるのである。

加之最近コーン(Corn)氏及びウイノグラッドスキー(Winogradsky)氏等に依つて土壤細菌の自然的培養法(Spontaneous Culture)が案出され直接的に細菌を研究せんとする所謂 Direct method なるものが企圖するに至つた。如斯して今や土壤細菌の研究竝に其應用は駁々として底止する所なき狀態である。

さればこの研究法に就いては遂時新しき合理的方法が案出され漸次改良されてゆくことは自然の趨勢であつて我々

は常により良き研究法を考察検討し且つ公表されたる新方法を應用適合せんと心掛けてゐるのである。

併して土壤學並に肥料學の研究は之を純理化學的研究のみに俟つて完璧するものでなくして之に生物學的研究を加へなければならぬことは今更論を要しない所である。

故に本邦に於ける土壤肥料學專攻者間に於いても最近漸く土壤細菌學の研究を必要と認めこれに従事せんとするものと起り交つたことは當然のことであると云はねばならぬ。

然共この研究に必要な参考文献にあつては邦文のものは極めて少なく殆ど歐文に依らねばならぬ状態である。

依つて著者は些か同學諸氏の參考に資せんとしてここに當研究室に於いて日常使用しつゝある研究方法を基礎に本編を企圖したものであつて更に一層廣汎に且つ精密を要せらる方は次の文獻に就きて參照せられんことを願ふ次第である。

Waksman, S. A., Principles of Soil Microbiology, 1927.

Aberhalden, E. (S. A. Waksman), Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. Abt. XI. Teil 3. Heft

5. (Methoden der mikrobiologischen Bodenforschung), 1927.

Lehman, F., Landwirtschaftlich-bakteriologisches Praktikum, 2nd. Ed. 1920.

Gillner, W., A Laboratory Manual in General Microbiology, 3rd. Ed. 1926.

Fred, E. B., A Laboratory Manual of Soil Bacteriology, 1916.

Society of American Bacteriologists, Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria, 1923.

二、土壤細菌に關する研究法

A 細菌の純粹培養並に其研究法

細菌の純粹培養に使用する主要なる培養基の調製法は次の通である。

一、培養基の調製法

1 肉汁液 (Beef-extract Broth)

肉汁 (市販肉キエス)

三瓦

ペプトン

五瓦

蒸溜水

一〇〇〇瓦

2 肉汁寒天 (Nutrient Agar)

肉汁液に一五瓦の寒天を添加する。

3 純ゲラチン (Plain gelatin)

ゲラチン (Gold Label Gelatin)

一二〇瓦

蒸溜水

一〇〇〇瓦

4 肉汁ゲラチン (Nutrient Gelatin)

肉汁液にゲラチン一二〇瓦を添加し反應を Brom thymol blue を以つて中性となる様調節する。

5 含糖肉汁寒天並に液 (Sugar Agar and Sugar Broth)

肉汁寒天及び肉汁液に1%の炭水化物を添加する。

6 肉汁硝酸液 (Nitrate Broth)

肉汁液に0.1%の純硝酸加里を添加する。場合に依つては更に一五瓦の寒天を加へ肉汁硝酸寒天とする。

7 澱粉寒天 (Starch Agar)

肉汁寒天に0.2%の水溶性澱粉を添加する。

而して之等の培養基に用ゆべき水素イオン濃度調節用の指示薬には0.04%の Brom thymol blue 九五%アルコール液並に0.01%の Phenol red 九五%アルコール液を用ゆる。

二、細菌の形態學的検査法

1 運動性 本法は熟練する時は單に鏡檢にて確定し得るけれ共最も適當なる方法は其鞭毛染色に依るのを可とする。染色法は多々あるが就中良法と思ふものは最近報告されたグレイ (Gray) 氏法であつて次の如く操作するものである。

媒 染 劑

A 液

加里明礬 飽和水溶液 五珎

單 寧 酸 二〇%水溶液 二珎

土壤細菌研究法の概要

昇 汞 飽和水溶液 二坩

B 液

鹽基性(酸性)フクシン 飽和酒精液 〇、四坩

備考 本混合液は二四時間は有効である。

調製したるA液にB液を添加混合してその儘使用するのであつて操作は清淨なる載物硝子を四〇乃至五〇度のオープン(Oven)中にて微温ならしめ一白金耳の菌株を薄長く附着せしめ再びオープン中で乾固する。一〇分間染色後水洗し更にZiehl's Carbol fuchsin で五乃至一〇分間再染し水洗後乾燥して鏡檢する。

2 孢子形成 孢子形成は熟練する時には鏡檢にても確定し得らるゝけれ共次の如き染色法を行ふ際は一層安全である。

即ち載物硝子に菌株を附着し三回炎上で固定したる後五分間温 Carbol fuchsin で染色する。之を二、五%の醋酸で脱色水洗して更に Löffler's methylen blue で一〇秒間再染し水洗乾固して鏡檢するのである。

3 莢膜 莢膜 (Capsule) の染色は次の如く行ふものである。

即ち菌株は蒸溜水を使用せずして載物硝子に附着せしめ氣乾後炎上にて固定する。之を直ちに醋酸を以つて流過(水洗せず)し可成的に迅速に Carbol fuchsin 又は Anilin Gentian Violet で三回酸性を洗ひ一%の食鹽水でマウントして鏡檢する。

4 特殊染色 特殊染色法としてグラム染色を行ふのであるがその操作は次の通である。

染色劑

第一液 Ehrlich Anilin Gentian Violet

ジエンセン又はクリスタル紫(飽和酒精液)

六匁

酒精

五匁

アニリン水(水九八匁にアニリン二匁を加ふ)

五〇匁

第二液 Lugol's Iodine Solution

沃度

一瓦

沃度加里

二瓦

蒸溜水

三〇〇匁

本法を行ふには先づ第一液で染色しその儘洗滌せず第二液を以つて夫々一分間宛染色し之を九五%アルコールにて三〇秒間脱色する。重染の必要ある時は Saffranin 飽和アルコール液を一に水一〇の割合で調製したる染色劑を用ゆる。

三、細菌の生理的作用檢定法

1 グラチン溶解性 普通は純グラチン培養基に穿刺培養を行ひ攝氏二〇度に所定期間保温する。併し細菌の種類に依つては三七度又は適温に標準と共に保温し置き所定の期間後冷水中にて之を冷却する時は標準又は不溶解性のものは固化するけれ共溶解性のものは固化しない。

2 酸素に對する關係 普通はブフナー (Buchner) 氏管を用ゆる。使用するバイロガリク酸 (Pyrogallie Acid)

は一〇〇瓦の管では一瓦之に一〇%苛性加里(又は苛性曹達)一〇瓦を加へる。凡そ大型の試験管中には〇、〇四四九瓦の酸素を含有するのであるが五%のバイロガリツク酸三〇瓦を用ゆればよく〇、〇四七六瓦の酸素を吸収する力があるので充分である。尙本検定に關して細谷省吾氏はチステインを應用して嫌氣性細菌の新培養法を案出されたが適應し得らるゝと思ふものである。詳細は實驗醫學雜誌第一〇卷第三號二二頁大正一五年を参照願ひたい。

3 炭水化物の醱酵 普通は所定の培養基に Brom Cresol Purple 又は Brom Cresol Green 等の指示薬を加へ所謂指示薬培養基を調製して之に細菌を培養しその水素イオン濃度の變化を觀測するのである。(西門義一著本誌第九卷大正一五年參照)今指示薬の感能度を示せば次の通である。

第一表 指示薬の感能度

指示薬	PH
Br. Cres. Purple	七、〇 六、〇 五、五 五、〇 四、〇 三、〇
Br. Cres. Green	紫 ————— 黄
Br. Chlor. Ph. Blue	綠 ————— 黄
	青 ————— 黄

併し一屏精確を期せんとする時にはキンヒドロン電極法を用ひて電氣的に水素イオン濃度を測定しそのPHを算定するのがよい。(本法に關しては拙著鳥取農學會報第一卷第二號を參照)

又此際瓦斯發生の有無を檢定するには普通スミス (Smith) 氏酸酵管に液態培養基を注加し常法にて殺菌後被檢細菌を接種してその發生瓦斯量をフロスト (Frost) 氏ガスメーターで觀測するのであるが單に定性の場合は穿刺培養或は劃線培養で目的を達することが出来る。

4 牛乳より酸生成 普通はリトマスミルクを用ゆるが指示藥ミルクを用ゆれば一層精確である。
今其指示藥と感能度を示せば次の通である。

第二表 牛乳培養基に於ける指示藥の感能度

反應	指示藥の感能度	PH 價 概 數
中 性	Brom Cresol Purple 標準色青色乃至灰綠色	六、二—六、八
微 弱 酸	中性より幾分灰綠色乃至綠黃色	五、二—六、〇
弱 酸	Br. Cres. Purp. にて黃色凝固せず	四、七—六、〇
強 酸	凝固 Br.-Chlor Phenol red に青色乃至綠色	三、四—四、六
最 強 酸	Br.-Chlor Phenol blue に黃色	三、四—

尙この外 Peptonization をも觀察するを要する。

5 硝酸還元性 培養基には〇、一%硝酸肉汁寒天を用ゆる。若し瓦斯(窒素)を發生する場合は寒天に罅裂を生ずる。
生成亞硝酸量の檢定には次に示す如きグリース (Griess) 氏試藥を使用する。

第一液

Sulphanilic Acid を二〇% 醋酸液一五〇ㄔに〇、五瓦溶解する。

第二液

α -Naphthylamine hydrochloride を二〇% 醋酸液一五〇ㄔに〇、二瓦溶解する。

使用法は右兩液を等量宛混合して被檢培養に加へる。亞硝酸の存在に依つて深紅色を呈する。

又アムモニヤ生成の檢定にはネッスラー試薬以外にトーマス (Thomas) 氏檢定法を使用する。

トーマス氏試薬の調製法は次の通である。

第一液

石炭酸 五% 溶液

第二液

一% の可溶鹽素を含有する次亞鹽素酸曹達液

備考 第二液の調製は次亞鹽素酸曹達液一ㄔを醋酸並に沃度加里の存在にて澱粉を指示薬とし一〇分の一規定亞硫酸曹達液(一立に二四、八瓦を含有)の二、八六ㄔで中和する様に調節する。

操作は右の兩液を夫々一ㄔ宛被檢培養に加へ三〇分間放置する時はアムモニヤの存在に依つて青色を呈するに至る。
遊離窒素の發生試験には砂糖類醱酵檢定法(三四頁)に準じて操作するのである。

6 色素生成 肉汁寒天上に生成する被檢細菌の色素を觀測する外に馬鈴薯及びゲラチン等をも併用するものである。

7 澱粉加水分解性 本法は Diastase の存否を検定するものであつて通常〇・二%の可溶性澱粉肉汁寒天を培養基として用ゆる。操作は一旦溶解せしめた右培養基をペトリ皿に注加し扁平に固化し置き被檢細菌を劃線培養し保温する。檢定には五〇%酒精に飽和したる沃度液を作用せしむる。斯くする時は Diastase に依つて澱粉の加水分解を受けたる場合は不染帶 (None) の判然と生成する故直ちに判別し得られる。この外ゴットハイル (Gottlieb) 氏法をも亦用ひられる。本法は豫め八瓯宛の液培養基を含有する試験管を用意し被檢細菌を二八度に四週間培養する。かくてその一本の試験管は煮沸浴中で酵素を破壊し置き他の試験管にはクロ、ホルム又はトルオールを一滴加へ之等兩試験管に殺菌澱粉液四瓯(水五〇〇瓯に〇・二五瓦の澱粉を含有する)宛を注加し一晝夜保温し置きたる後沃度沃加里液(沃度一瓦沃加里一瓦を水四〇〇瓯に溶解したるもの)を滴下する時細菌試験管が加熱試験管より弱き青色を呈したる際は加水分解の行はれたるものと檢定するのである。

8 インドール生成 普通標準肉汁培養基を用ゆるが一旦トリプシンで消化したる肉汁培養基を用ゆる場合もある。檢定法にザルコウスキー (Salzkowski) 氏法ヴァニリン (Vanillin) 法及びヘルリッヒ (Ehrlich) 氏法等があるが就中ザルコウスキー氏法が良く用ひられる。その方法は次の通である。

即ち被檢培養基五瓯を試験管に取り之に其凡そ三分の一量の稀釋硫酸(濃硫酸一容と水一容との混合)を注加して良く混合し置き此表面に靜かに〇・〇二%の亞硝酸曹達液を少量滴加する。この際インドールの存在する時は兩液の境界に淡紅色帶の形成するのを觀測することが出来る。尙精確を要する時はゴーレ (Gore) 氏法を行ふがよい。本法には次の如き試薬を調製するを要する。

Bohme's 第一液

Para-dimethyl-amino-benzaldehyde

一瓦

純アルコール

九五瓦

鹽酸

二〇瓦

Bohme's 第二液

過硫酸加里

一瓦

蒸溜水

一〇〇瓦

培養基の綿栓は純白脱脂綿を用ひ檢定に當つてはこの綿栓に先づ第二液を四乃至六滴吸收せしめ次に第一液を等量吸收せしめ培養基の液面より一乃至一、五吋の所まで押しさげて栓を成し之を煮沸浴中に一五分鐘垂直に放置(綿栓に培養基の附着せぬ様に注意を要する)する時はインドールの存在に依つては綿栓が赤色に染色する。之はインドールの揮發性なるを應用したものである。

9 硫化水素の生成 通常醋酸鉛紙を培養基の綿栓に挿みて檢定するが最近ハクリグラー(Kriger)氏法を用ゆる。本法は標準肉汁寒天のペプトンを三〇瓦に増量し其PH價を七、二乃至七、六に調節し置き五瓦宛を各試験管に注加して殺菌する。他に〇、一%の鹽基性醋酸鉛液を殺菌し置き肉汁寒天の五〇度に冷却したる際五瓦注加し斜面とすることなくその儘固化せしめて穿刺培養を行ふ。硫化水素の發生に依つて醋酸鉛は硫化鉛の黒輝色を呈するに至る。

10 Acetyl methyl Cabinol 生成 本法は之を別にフオゲス・プロスカウ(Vogel-Proskauer)氏反應とも云ふ。被

檢細菌を發酵管法に依つて培養し培養基に葡萄糖肉汁液又は磷酸加里葡萄糖肉汁液を用ひて三七度に二乃至三日間培養し置き之に五〇%の苛性加里液を一坵加へ室溫に二四時間放置する。Acetyl methyl CabinoI の存在に依つてエオシン紅色を呈する。又時には一乃至四坵の一〇%苛性曹達液を五坵加へ煮沸して速急に反應を呈せしむることも出来る。この際その存在しない時は只單に黃色を呈するのみである。



土 壤 探 集 用 具
第 一 集 用 縮 圖 器 具

B 土壤肥沃の細菌學的研究法

土壤肥沃の細菌學的研究法として通常使用せらるる土壤の含有細菌數、アムモニヤ化成作用、硝酸化成作用、硝酸還元作用、窒素固定作用、纖維素分解作用、炭酸瓦斯發生作用等に就きてその研究法を概述すれば凡そ次の通りである。

一、供試土壤の採集法

供試土壤の採集は研究上最も重要な事項に屬してゐる。採集個所は採集地(圃場)の代表的なる地點を四乃至五個所選びて採集し採集土壤は殺菌狀態に於て注意して充分混合しその一部分を用ゆる。採集深度は殊に注意を拂ひ地表約四分の一吋は殺菌用具

(金屬製筥)にて取去り豫め殺菌し置きたる第一圖に示す如き採集用具を六乃至六、五吋打込みて採集する。勿論深度に於ける細菌数は土壤の種類に依つて變化があるけれ共大體右に示した所が最大量となつてゐる。

二、土壤の細菌數測定法

土壤の細菌數量測定法には凡そ次の三種類がある。

- 1 稀釋法 (Dilution method)
- 2 直接法 (Direct Counting method)
- 3 扁平法 (Plate method)

1 稀釋法 本法は豫め秤量し置きたる供試土壤を常法に従つて殺菌水(井水)を用ひて適宜に稀釋しゆき最後の試験管中に唯一個の菌子を含む程度に迄至らしむる。併して各試験管より其一定量(通常一坵)宛をとり適當なる培養基に移植し所定の方法によつて保温する時は試料一瓦又は一坵中に含有する細菌數量を算定することが出来る。本法に依れば細菌總數の算定をなし得る外に其生理的分類(Physiological groups)に従つて其概數を知り得る利益があるが其間の操作が相當煩雜で且つその正確度は扁平法に劣ると見られてゐる。

本法に供する二三の培養基を示せば次の通である。

1、硝酸化成菌用培養基 (Winogradsky's medium)

亞硝酸曹達

二〇瓦

炭酸曹達

一〇瓦

鹽基性磷酸加里 〇、五瓦

寒 天 一五、〇瓦

蒸 溜 水 一〇〇〇、〇瓦

ロ、硝酸還元菌用培養基 (Gillay's medium)

第一液

蒸 溜 水 二五〇瓦

硝、酸加里 二瓦

アスパラギン 一瓦

第二液

蒸 溜 水 五〇〇瓦

酒 石 酸 五瓦

酸性磷酸加里 二瓦

硫酸苦土 二瓦

鹽 化 石 灰 〇、二瓦

鹽 化 鐵 痕跡

注意 第二液は一〇%の苛性曹達又は加里でフェノールフタールエンを指示薬として中和した後第一液と混合して蒸溜水で一立に調製し寒天二〇瓦を加へて常法に従つて殺菌する。

ハ、窒素固定菌用培養基 (Beijerinck's medium)

井 水 一〇〇〇、〇瓦

マンナイト 二〇、〇瓦

鹽基性磷酸加里

〇、二瓦

この場合マンナイトは糊精、グリセリンで井水は土壤浸出液で代用し得らる。

ニ、嫌氣性細菌用培養基

蒸溜水	一〇〇〇、〇鈍
鹽基性磷酸加里	三、〇瓦
硫酸苦土	〇、二瓦
食鹽	〇、〇一瓦
硫酸鐵	〇、〇一瓦
葡萄糖	一〇、〇瓦
枸橼酸石灰	一、〇瓦
寒天	二〇、〇瓦

嫌氣的培養法は前述の酸素との關係(第三三頁)に従つてペトリ皿を納めたる容器中の酸素を除いて保温するのである。

2 直接法 本法は一九一八年コーン(Conn)氏の考案に懸り後一九二四年ウイノグラツドスキー(Winogradsky)氏の改良したものであつて何等培養基を用ひず土壤細菌を特殊の處理に従つて直接に鏡檢しその概數を計算する方法である。今その操作を示せば次の通である。

供試土壤として混合粉末としたものを普通乾土で一瓦試験管に秤量して之に蒸溜水四ccを加へ五分間激しく振盪する。之を三〇秒放置すると多量の無機質物の沈澱が懸濁液の下に沈降來してゐる。この懸濁液は豫め用意したる手廻遠心分離器の沈澱管に注入し引續き蒸溜水を三cc宛二回沈澱物に加へ一分間宛振盪して三〇秒宛放置し懸濁液は全部同一沈澱管に注集する。即ち一瓦の土壤を一〇ccの蒸溜水で洗滌することになる。かくして得たる沈澱を第一供試沈澱として取扱ふ。

次に遠心分離沈澱管中の懸濁液は遠心分離法に依つて沈澱を沈降せしめ之を第二供試沈澱とする。

次にこの遠心分離法に依つて得たる懸濁液は注意して半量を取り他の沈澱管に納め前法に準じて第三供試沈澱を生成せしむる。

斯の如くして調製した各沈澱物（又は懸濁液）の一滴（〇・〇一cc）を載物硝子に一平方糎に擴げオープンで乾固し第一及び第二沈澱は一％の溫寒天液で第三沈澱は〇・一％の冷寒天液で急速に被覆する。懸濁液にはこの固定操作の要はない。

寒天が乾固すれば純酒精で固定し五％の石炭酸に溶解した酸性染色剤で常法の如く染色する。普通はローズベンガル（Rose bengal）を用ゐるがエリスロシン（Erythrosine）が最良である。

本法では莢膜及び粘質物は染色しないが Nitrosomonads は最も良く染色し之を更に鹽基性染色剤で再染すると他の細菌も染色することが出来る。コロイドは染色が弱い。染色剤は五乃至一五分間冷水又は微溫水に浸した後數秒水で洗滌し寒天は冷水で脱色することが出来る。

本法に依つて細菌數を得るには顯微鏡を次の如く調節する必要がある。即ち顯微鏡は油浸裝置を用ひ接物鏡には一、九耗（1/12）のものを使用する。そして對物測微計で視野の直徑を〇、二〇五耗となる様に鏡筒の長さと接眼鏡の種類を選んで置く。

今一視野間の平均細菌數が六〇乃至一〇〇あつたとすればこれに三〇〇、〇〇〇なる因子を乗すると一瓦（但し供試土壤の〇、〇一瓦を鏡檢したと假定）中の細菌實數を得ることが出来る。

この因子は次の如くして算定したものである。

r を視野の半徑とすれば

$$r = \frac{0.205}{2} \text{ 耗} = 0.103 \text{ 耗}$$

$$r^2 = 0.0106 \text{ 耗}$$

$$\text{視野の面積 } \pi r^2 = 3.1416 \times 0.0106 = 0.0335 \text{ 平方耗}$$

$$\begin{array}{l} \text{塗着標本} \quad 1 \text{ 平方耗} \quad 100 \\ \text{視野面積} = 0.0335 \text{ 平方耗} = \frac{100}{0.0335} \text{ 平方耗} = 2.985 \quad \text{即ち } 3000 \text{ 近似數} \end{array}$$

随つて一視野の面積は塗着標本面積の三〇〇〇分の一に相當する。然るに塗着標本は可檢土壤の〇、〇一瓦を含有するから一視野の容積は三〇〇〇〇〇分の一（ $0.01 \times 1/3000$ ）となり三〇〇、〇〇〇なる因子を得ることが出来るのである。

併し本法は未だ完全したる方法ではないのであつて特殊の場合の外應用されてゐない。

3 扁平法 本法は現在最も廣く使用されつゝある方法であつて次の如き操作を行ふものである。

供試土壤は殺菌甕で充分混合し若し礫の存在する場合は一耗の殺菌篩で篩別したるものを豫め用意して置いた二五〇
ccの三角瓶に井水一〇〇ccを入れ殺菌したる容器に取る。この際の稀釋度は一對一〇(即ち一〇瓦)又は一對二〇(即
ち五瓦)とする。

土壤が有機物に富む時は稀釋すべき殺菌水を加へて乳鉢で泥狀に破壊するを要する。

かくて之を手を以つて正確に五分間振盪する。若し振盪時間が五分以内の際は土粒と細菌との分離が不充分であるし
長時間の際は嘗つて細菌が破滅する如き結果を生ずる。而してこの一耗を殺菌ビベットにて他に用意した九九種の殺菌
井水を含有する三角瓶に稀釋して三〇秒振盪する。(この際一〇ccの懸濁液を九〇ccの井水に稀釋してもよい)。

かくて最後の稀釋度を一〇〇〇分の一又は二〇〇〇分の一となしペトリ皿一個に對して四〇乃至二〇〇個の聚落が
形成し得るを程度とする。

この最後の稀釋懸濁液は一耗を殺菌ペトリ皿に取りて適當なる培養基を豫め溶解しておいて之に流しこみ皿を水平
に良く廻して平均に懸濁液と培養基を混合して静置し固化せしめた後皿を反轉して保温する。

保温中の溫度は普通二五乃至二七度(二八乃至三〇度)であつてゲラチン培養基の時は一八度とする。

保温期間は細菌に對しては七日間(八日乃至一〇日間)放射狀菌(*Actinomyces*)に對しては一四日間を適當とする。
其間時々形成する聚落の數を計算し計算した分は皿上に印を附して置くこと好都合である。この際普通は肉眼で充分とさ
れてゐる。尙供試土壤一種に對して行ふ扁平培養は五乃至一〇個の平均を要する。

本法に用ゆる培養基には普通次の如きものを使用する。

イ、アルブミン寒天 (Albumin Agar)

葡萄糖 一、〇瓦

鹽基性磷酸加里 〇、五瓦

硫酸苦土 〇、二瓦

硫酸々化鐵 痕跡

卵白アルブミン(粉末) 〇、二五瓦

蒸溜水 一〇〇〇、〇瓦

寒天 一五、〇瓦

注意 アルブミンは豫め五乃至一〇瓦の水に溶解し〇、一規定苛性曹達をフェノールフターレンを指示薬としたる場合鮮紅色となるまで加へ他の成分を濾過したる後一諸に混合する。

ロ、カゼイン寒天 (Casein Agar)

カゼイン一瓦を〇、一規定苛性曹達八瓦に溶解してアルブミン寒天中よりアルブミンを除きたる他の成分と混合し之に準じて調製する。カゼインはハンマーステン (Hammarsten) 氏又はヴァン、スライク (Van Slyke) 氏法に依つて調製する。

ハ、土壤浸出液寒天又はゲラチン (Soil-extract agar or Gelatin)

土壤浸出液

一〇〇 毫

鹽基性磷酸加里

〇、五 瓦

(食 鹽)

(五、〇 瓦)

寒 天

一五、〇 瓦

蒸 溜 水

九〇〇、〇 毫

(ゲラチン)

(一五〇、〇 瓦)

注意 土壤浸出液は肥沃土一盞に井水一立を加へて一五封度壓のオートクレヴで三〇分間加熱し生石灰の少量と共に濾別する。食鹽はゲラチン溶解菌の増殖を抑制する爲めに用ゆるものである。

ニ、アスパラギン、マンナイト寒天 (Asparagine-mannite agar)

鹽基性磷酸加里

一、〇 瓦

硫酸 苦 士

〇、二 瓦

鹽化石灰

〇、一 瓦

食 鹽

〇、一 瓦

鹽 化 鐵

〇、〇〇二 瓦

硝酸加里

〇、五 瓦

アスパラギン

〇、五 瓦

マンナイト 一、〇瓦

寒 天 一五、〇瓦

蒸 溜 水 一〇〇〇、〇珎

注意 マンナイトは寒天及び他の成分の溶解後加へて之を濾過し反應はPH七、四として用ゆる。

以上の内で最も廣く用ひらるゝのはアルブミン寒天である。而して一般にその反應はPH六、二乃至六、八の所を用ひPH六、五が最も良好である。

微類の數量を測定するには普通特殊培養基を用ひその稀釋度は細菌の場合の一〇〇分の一に稀釋したものをとり他は之を細菌の場合に準じて操作する。

培養保溫期間は二乃至三日間で充分である。

特殊培養基は次の如きものを用ひてゐる。

葡 萄 糖 一〇、〇瓦

ペプトン 五、〇瓦

酸性磷酸加里 一、〇瓦

硫酸苦土 〇、五瓦

寒 天 二五、〇—三〇、〇瓦

蒸 溜 水 一〇〇〇、〇珎

注意 本培養基は之を規定硫酸又は規定磷酸を以つて PH 四・〇に調節して用ゆる。

斯の如くして得たる細菌聚落よりその實數を得るには次の如き計算法に依るものである。

$$N = \frac{a \cdot u \cdot 100}{100 - x}$$

備考 Nは細菌實數、aは各培養基上の平均聚落數、uは稀釋度の數、xは原土壤の水分量。
尙本法に於ける誤差の計算は次の方法で行ふ。

$$\text{平均誤差} = \sqrt{\frac{\sum (Zn - a)^2}{n - 1}}$$

$$\text{中央誤差} = \pm 0.6745 \sqrt{\frac{\sum (Zn - a)^2}{(n(n-1))}}$$

$$\text{變異係數} = \frac{\text{平均誤差} \times 100}{\text{平均}}$$

$$\text{誤差：平均} = \frac{\text{中央誤差} \times 100}{\text{平均}}$$

備考 (Zn-a)²は聚落平均數を各聚落數より減じたる數の二乗を示す。

而してこの方法に依つて計算したる數と中央誤差との比は同一土壤に對して二・〇乃至二・五%以下、同一地域の各土壤に對しては三・〇%なることを要する。

三、アムモニヤ化作用檢定法

アムモニヤ化作用を檢定するには溶液培養檢定法と土壤培養檢定法とがある。

イ、溶液培養檢定法 溶液培養檢定法に使用する培養基は二五〇珎入の三角瓶にペプトン、カゼイン、ガラチン又は尿素の如き可檢物の一%液を一〇〇珎並に〇、〇五%の鹽基性燐酸加里を加へ(又は加へず)て一五分間一五封壓で蒸氣殺菌したものをを用ゆる。この際カゼインは使用前に〇、一規定苛性曹達で溶解し同濃度の鹽酸でPH六、五乃至七、〇に調節して後之を培養基とする。

供試土壤は一〇%の懸濁液(五分間振盪したるもの)を一〇珎接種し二八乃至三〇度に三乃至七日間保温したる後化成アンモニヤ量を酸化苦土法で蒸溜して測定する。この際用ゆべき酸化苦土は一瓦を適當とする。

ロ、土壤培養檢定法 土壤培養檢定法は新鮮土壤一〇〇瓦に可檢含窒素物(血粉等)を一瓦加へ適當の濕度を保たしめ全ての操作を溶液法に従つて行ふものである。

四、硝酸化作用檢定法

硝化作用の檢定法は次に示す如く目的に従つて五種の檢定法がある。

イ、溶液培養並に細砂培養檢定法 溶液培養法は三〇珎の窒素を含有する硫酸アムモニヤに炭酸石灰又は苦土(其他必要に應じて礦物質養素を加ふ)を加へて溶液培養基を作り一〇%の供試土壤懸濁液を一〇珎接種し二八乃至三〇度に三〇日間保温し生成硝酸量をフェノール、ダイサルフォニック酸(Phenol-disulfonic acid)法で測定する。

細砂培養法は一〇〇瓦の純細砂を二一〇珎の炭酸石灰と共に二五〇珎入の三角瓶に取り更に培養液(井水一立鹽基性燐酸加里二瓦硫酸苦土一瓦硫酸鐵〇、四瓦)一五珎を加へて一時間蒸壓殺菌し後窒素三〇珎を含有する殺菌硫酸液アムモ

ニヤ液を五匁添加して培養基となし之に一〇瓦の供試土壤を接種して二八乃至三〇度に三〇日間保温する。硝酸定量法は前法に準ずる。

ロ、供試土壤含有窒素の硝化作用検定法 本法は所定の容器に供試土壤のみを一〇〇瓦とり水分を飽和度の五〇乃至六〇％に保持して二五乃至二八度に三〇日間保温する。硝酸の定量法は前法に準ずる。

ハ、硫酸アムモニヤの硝化作用検定法 供試土壤一〇〇瓦に窒素三〇匁に相當する硫酸アムモニヤを加へ適濕を保持しつゝ二五乃至二八度に三〇日間保温する。本法は緩衝物を加へないので土壤の緩衝力を判定することが出来る。尙檢定の前後に土壤の水素イオン濃度を測定するを要する。

ニ、硫酸アムモニヤの硝化作用檢定變法 本法は前法に準じて只硫酸アムモニヤの含有する三〇匁の窒素が完全酸化をなしたる場合の硝酸及び硫酸量を理論的に中和すべき炭酸石灰量を二一〇匁加へたものである。

ホ、有機含窒素物の硝化作用檢定法 本法は乾血粉の如き含窒素物に富む有機物（一〇乃至一二％）又は棉實粕大豆粕綠肥作物乾粉等の如き（〇・五乃至一・〇％）有機物に適用するものであつて前法に準じ二五乃至二八度に保温して一五日及び三〇日目に生成硝酸量を測定する。

今以上述べたる場合に於ける硝酸の測定法を示すに次の通である。

土壤培養法にあつては蒸溜水二〇〇匁と共に土壤五〇瓦を三角瓶に取り之に少量の酸化石灰を加へて一〇乃至一五分間振盪して濾紙で濾過すると清澄液を得る。この二〇匁（原土五瓦）を蒸發皿に取りて蒸發乾固したる後二匁のフェノール、デイ、サルフォニック酸を加へて硝子棒で充分混和する。かくてアムモニヤ水を適加しカナリヤ黄色を呈するに至

らしめ之を比色計で比色定量するのである。

今フェノールデイサルフォニック酸法に依る硝酸態窒素の定量に用する試薬の調製法を示せば次の通である。

イ、フェノールデイサルフォニック酸液 濃硫酸一五〇ㄔに純白、石炭酸を二五瓦溶解せしめて之に發煙硫酸（無水硫酸一三乃至一五%）の七五ㄔを添加し一〇〇度に二時間加熱して製する。

ロ、標準硝酸液 硝酸を含有しない蒸溜水一立に〇、七二三瓦の純硝酸加里を溶解しこの五〇ㄔを取りて蒸發皿で乾固する。かくてフェノール、デイ、サルフォニック酸液二ㄔを加へ硝子棒でよく混和したる後之を五〇〇ㄔに稀釋する時この一ㄔは硝酸態窒素の〇、〇一ㄔを含有する液に相當する。そしてこの溶液は永久に保存し得るのである。

五、硝酸還元作用檢定法

硝酸還元作用の檢定法に對しては次に示す如き培養基を使用する。

イ、鹽基性磷酸加里

〇、五瓦

硝酸加里

一〇、〇瓦

酒 精

五、〇ㄔ

井 水

一〇〇〇、〇ㄔ

ロ、ペプトン

一、〇瓦

硝酸加里

二、〇瓦

井 水

一〇〇〇、〇ㄔ

ハ、酒石酸石灰(又は枸橼酸)

二〇、〇瓦

硝酸 加里

一五、〇瓦

鹽基性磷酸加里

〇、五瓦

井 水

一〇〇〇、〇吨

供試土壤は一〇%の懸濁液(五分開振盪したるもの)を一〇吨接種し二八乃至三〇度に三乃至四週間保温したる後還元したる亞硝酸量はグリイス氏法即ちサルファニリツク酸並にアルファ、ナフチールアミン混合液で定量し又還元アムモニヤ量は通氣法(Aeration method)に依つて測定する。

又遊離窒素瓦斯を簡易に測定するには右に示した如き培養基をスミス氏酸酵管に取り之を細菌の純粹培養中その生理的作用檢定法(第三五頁)の所に於いて述べたる方法に従つて行ふのである。

尙土壤を培養基として本試験を行ふ際は之を硝酸化作用の檢定法に準じ夫々適當なる方法を用ひて化成分の量を檢定するのである。

今標準亞硝酸液の調製法を述べれば次の通である。

一、一瓦の純亞硝酸銀を亞硝酸の含有なき蒸溜水に溶解し鹽化曹達を用ひてその銀を全く沈澱せしめ之を一立となる様稀釋する。

この液より一〇〇吨を取りて再び一立となし、之より又一〇吨をとりて更に一立とすればこの一吨は〇、〇〇〇一吨の亞硝酸態窒素を含有する液となる。

六、窒素固定作用検定法

窒素固定作用の検定法は凡そ次の如き五種の方法がある。

イ、溶液培養基法 本法は標準マンナイト (Mannite) 培養基として蒸溜水一立にマンナイト一〇乃至二〇瓦、硫酸苦土〇・二瓦酸性磷酸加里〇・二瓦食鹽〇・二瓦石膏〇・一瓦炭酸石灰五・〇瓦を含有せしめフェノールフターレン指示薬で中和したるものを五〇乃至一〇〇珎とり之に供試土壤を五乃至一〇瓦接種して適温に七乃至二八日間保温したる後ケルゲール氏法に依つてその全窒素を測定する。而してこの際原培養基に供試土壤を接種し直ちに全窒素を測定して置いたるものを標準とする。

ロ、土壤培養法 新鮮土壤一〇〇瓦に一乃至二瓦のマンナイトを添加し適湿を與へ前法に従つて測定する。

ハ、純粹培養法 本法は二%のマンナイト培養基(磷酸を特に含有しないもの)一〇〇珎に供試土壤一〇瓦竝にアゾトバクター (Azotobacter) の純粹培養を充分接種し二〇乃至三〇日間保温したる後前法に従つて全窒素量を測定する。而して本法は供試土壤の可溶性磷酸の検定法とも成り得るものである。

ニ、殘留マンナイト測定法 本法は寧ろ溶解性有機物の殘留量を檢定する方法であつて氣乾土壤の二%に相當するマンナイトを加へ適湿を與へて保温し五日間毎に過マンガン酸加里法に依つて殘留するマンナイト量を測定する。その操作は該土壤五瓦を氣乾態となし再秤したる後蒸溜水二〇〇珎を以つて二時間混合せしめてその浸出したる濾液を一〇珎採る。(原土の〇・二五瓦)之を四〇〇珎のピーカーに注ぎ之に〇・〇五規定過マンガン酸加里液を五〇珎加へ更に稀硫酸(六對一〇〇)三珎を添加する。このピーカーを二〇分間煮沸して之に同濃度の蔭酸を五〇珎加へたる後之を〇・〇二規

定過マンガン酸加里液で滴定する。この滴定量(耗)は残留マンナイト並に可溶性の土壤有機物量に相當する。

ホ、硅酸ゲル培養法 本法は最近ウイノグラツドスキー氏の案出したる方法であつて大型の硅酸ゲル培養基に二瓦のマンナイト並に一瓦の供試土壤を接種して四八時間に形成するアグトバクターの聚落を一二〇時間目に全窒素を測定するものであるが詳細は土壤肥料學雜誌第二卷第三號昭和三年九月板野新夫荒川左千代共著「水田土壤に Winogradsky's Azotobacter test の應用」なる論文を參照して頂きたい。

七、纖維素分解作用檢定法

纖維素分解作用の檢定法は凡そ次の四種の如き方法がある。

イ、土壤培養法 新鮮土壤一〇〇瓦に細末とした纖維素一瓦を加へ充分混合したる後適濕を保たしめて四二日間二五乃至二八度に保温する。次いでカーペンチア (Carpentier) 氏法に依つて分解残留する纖維素を定量し原纖維素よりの差を求めれば分解纖維素量となる。即ち二〇瓦の土壤に〇・二瓦の纖維素を添加したこととなるのである。

ロ、土壤硝酸鹽培養法 本法は前法に依つて處理する外に豫め〇・一瓦の硝酸曹達を添加するものであつて保温期間は一五日とする。

ハ、土壤並に礦物質培養法 本法は土壤一〇〇瓦に〇・二瓦の炭酸石灰、〇・〇五瓦の鹽基性磷酸加里、〇・〇二五瓦の硫酸苦土を添加し之に一瓦の細末纖維素を加減して二週間所定の方法で保温する。

而して本法では纖維素分解量を炭酸瓦斯法に依つて測定するものであつてその詳細は後述する炭酸瓦斯發生作用檢定法(第五七頁)の所に記載する。

かくして纖維素を添加しない場合の土壤より添加した土壤の方がより多量の炭酸瓦斯を發生するから之より計算でその分解量を算定する。又これに依ると土壤自身に抱含する可溶性窒素の量を大略豫知することが出来る。

ニ、溶液培養法 本法には次の如き培養基を使用する。

鹽基性磷酸加里	一瓦
硫酸 苦土	一瓦
食 鹽	一瓦
炭 酸 石 灰	二瓦
硫酸アムモニヤ(又硝酸曹達)	二瓦
蒸 溜 水	一〇〇〇珎

この培養液一〇〇珎に對して〇・五乃至一瓦の細末纖維素を添加し一〇%の振盪懸濁土壤液を一〇珎接種し所定の方法で一四日間保温する。

カーペンチア氏の纖維素定量法は次の通である。

先づシュヴァイツェル (Schweitzer) 氏の試薬を調製せねばならぬ。即ち二〇〇瓦の硫酸銅を煮沸水に溶解して之に鹽化アムモニヤを充分加へ一〇乃至二〇%苛性曹達液を添加する時は次の公式に従つて水酸化銅の沈澱を生成する。



この水酸化銅は充分水洗して鹽類を除去したる後比重〇・九二のアムモニヤ水に溶解すると紺青色をしたるシェヴァ

イツエル氏試薬が出来る。之は二四時間後に使用する。

溶液培養法の時はこの試薬一〇〇珎を加へて硝子棒で纖維素を含む培養基を攪拌すると纖維素は一時間位で充分溶解するから之に濃鹽酸一〇〇珎を加ふると纖維素は新緑色の液中に再び沈澱する。更に四〇〇珎の水を加へたる後豫め秤量乾燥して置いた濾紙にて濾し集め一〇%の鹽酸で充分洗ひ後鹽素の反應なきまで水洗して乾燥秤量する。尙液中には土粒の存在する故に纖維素が溶解したる後に遠心分離法又はアラムダムによつて土粒を分離するを要する。

尙別法に依れば次の通である。

溫水に硫酸銅二〇〇瓦を溶解し豫め計算し置きたるアムモニヤ水(比重〇・九のアムモニヤ水では九九珎)を加へて沈澱を作り過剰のアムモニヤは硫酸で中和する。沈澱は三乃至四回傾斜法で洗ひ濾別する。而してこの沈澱を比重〇・九の一のアムモニヤ水に溶解する時は(四乃至五時間を要する)該液一〇〇珎は一・五瓦の銅を含有する。該液五珎を硫酸乾燥器中で乾固し恒量になるまで加熱して銅を秤量する)。

尙土壤培養法の時はその二〇瓦をシュヴイツエル試薬一〇〇珎と共に取り密栓して振盪器にかけて振盪し三〇分の後放置する。溶液は石棉グーチ、タルジアルで濾別し濾液五〇珎を八〇%の酒精二〇〇珎中にとる。この際の沈澱をグーチタルジアルで濾別し(一)一%の鹽酸液(二)蒸溜水(三)二%苛性加里液(四)蒸溜水(五)一%の鹽酸液(六)蒸溜水(七)アルコール(八)エーテルの順序で精洗し十一〇度に於て恒溫となるまで乾燥したる後燃焼して再秤量する時はその差より土壤一〇瓦の所含する纖維素を知ることが出来る。

八、炭酸瓦斯發生作用檢定法

土壤の炭酸瓦斯發生作用を檢定するには凡そ次に示す如き四種の方法がある。

イ、新鮮土壤培養法 本法は六、五吋の深度より供試土壤を一肝採集し之を三耗の篩で篩別したる後ボットに納め適濕を與え、これに Respirometer を連結して一四日間その發生する炭酸瓦斯を測定する。

ロ、氣乾土壤培養法 本法は氣乾篩別したる供試土壤(所定の深度より採集したる)を一肝容器に納めたる後適濕を與へ二四時間後に發生炭酸瓦斯量を測定する。

ストクラサア (Stoklasa) 氏に従へば瘠土又は有機物の不足せる土壤にあつては八乃至一四耗肥沃土では約五六乃至八六耗の炭酸瓦斯を發生すると云ふ。

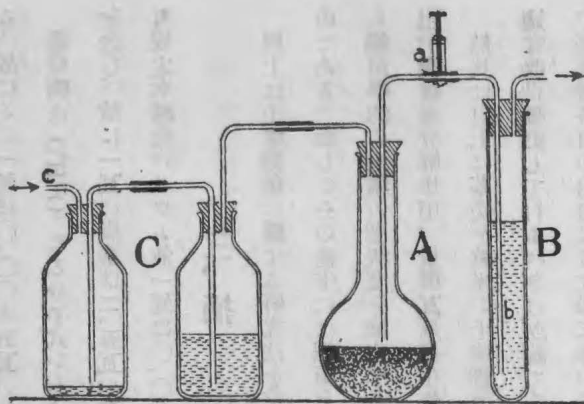
ハ、微類接種法 新鮮土壤を(イ)法に従つて採集し之を三〇〇耗入の平底フラスコに納め(第二圖)該土壤の保水力の五〇%に相當する水を添加し二日間一五封度壓で一乃至一、五時間宛蒸壓殺菌を行ふ。かくて之に蛋白質纖維素ベクチン及び其他の有機物を分解する力の最も強き *Trichoderma* (微類) 又は新鮮牛肥の懸浮液を接種し發生する炭酸瓦斯を水酸化バリウム法で一乃至一四日間測定する。この方法では肥沃な有機物の含有量多き土壤では八日間に約一二四、〇八耗瘠薄なる有機物の寡い土壤では約三七、四〇耗の炭酸瓦斯が發生すると云ふ。

ニ、葡萄糖分解力檢定法 本法は第二圖に示す如き装置のもとに檢定するのであつて新鮮土壤一〇〇瓦に適濕を與へ之に〇、五瓦の葡萄糖を加へ二五乃至二八溫度に保温して六時間又は一二時間毎に四八乃至七二時間その發生する炭酸瓦斯を測定する。

尙本法は葡萄糖以外に纖維素葉桿アルファアルファ乾未又は血粉等を用ひて檢定することも出来る。

本法の測定に用ゆる第二圖の如き裝置を解説するに次の通である。

供試土壤をボット内に納めて試験せんとするにはベル鐘で之を覆ひパラフィンで密封しこの一端を吸收管(B)に連結する。



第二圖
炭酸瓦斯測定裝置
(Wakeman 原圖)

他端は曹達石灰瓶及び一〇%液を入れたる硫酸瓶等の洗滌瓶(C)に連結しこの裝置に依つて空氣中の炭酸瓦斯を吸收せしめて無炭酸瓦斯の空氣を吸外ポンプで流過することが出来る。

發生する炭酸瓦斯は吸收管(B)又はツルオード(Troog)氏改良吸收管に吸收せしむる。この管には〇、二五規定の水酸化バリウムを五〇ㇼ(必要に應じて數個を連結する)を入れて置く。又通氣速度は一時間三立の空氣を排除する位とする。かくて過剰の水酸化バリウムは同濃度の醋酸液でフェノールフタレンを指示薬として逆滴定して炭酸瓦斯の實數を得ることが出来る。尙檢定の際は標準を同時に行ふを要する。

而して第二圖の如き供試土壤類(A)を用ゆる時は三〇〇ㇼ入位の平底フラスコを用ひ吸收管は一〇〇ㇼ位のものを用ゆる。

炭酸瓦斯並にこれより葡萄糖の量を計算するには次の如くにして行ふのである。



右の公式に依つて〇・二五規定水酸化バリウム液の一立は五、五瓦の炭酸瓦斯（一、五瓦の炭素）を含有するものに相當する。故にその一耗は〇、〇〇五五瓦の炭酸瓦斯（〇、〇〇一五瓦の炭素）を含有するものに相當することとなる。

葡萄糖は $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ なる分子式を有するを以つてその含有する炭素量は四%即ち一八〇瓦の葡萄糖に就いては七二瓦を含む。故に一瓦の炭素は二、五瓦の葡萄糖に相當する。従つて一、五瓦の炭素は三、七五瓦の葡萄糖に相當する故〇、二五規定水酸化バリウム液一耗は〇、〇〇三七五瓦の葡萄糖に相當することとなる。

二、摘

要

以上は土壌細菌に關する研究法を當研究室で日常使用しつゝある方法を基礎として之に多少の増補をして概述したものである。而してその前半には細菌を純粹に研究する上に殊に重要な培養基操作並に試薬等に就いて略説し後半は専ら細菌學的に土壌の肥沃度を檢定する方法即ち細菌數量、アムモニヤ化成作用、硝化作用、硝酸還元作用、窒素固定作用、纖維素分解作用、炭酸瓦斯發生作用等に就いて略述したものである。

然共は以上は基礎を歐米の土壌細菌學者の推奨する方法に因だものであるから本邦に於けるが如き水田土壌の場合は適宜改良變更して行ふべきは勿論である。且又之等の方法も隨時改良され又更に良法の案出さるゝものと考へらるゝので研究者各自の自由なる立場にあつて選擇應用さるべきものと思ふのである。

今本稿を終るに當つて殊に御教示を賜りし板野博士に感謝の意を表する次第である。

昭和三年六月三日於板野土壌細菌研究室